



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 0 502 983 B1

⑩ DE 690 28 312 T 2

⑤1 Int. Cl.⁸:
G 01 N 33/48
G 01 N 33/86
G 01 N 21/78

②1	Deutsches Aktenzeichen:	690 28 312.1
⑧6	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US90/07068
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	91.901 116.3
⑧7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 91/08461
⑧6	PCT-Anmeldetag:	3. 12. 90
⑧7	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	13. 6. 91
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	16. 9. 92
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	28. 8. 96
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	16. 1. 97

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1
01.12.89 US 443953

⑦3 Patentinhaber:
Akzo Nobel N.V., Arnheim/Arnhem, NL

⑦4 Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Wuesthoff & Wuesthoff,
81541 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,
SE

⑦2 Erfinder:
DRISCOLL, Richard, Cornelius, Raleigh, NC 27614,
US; FISCHER, Timothy, J., Raleigh, NC 27604, US

3

⑤4 VERFAHREN ZUR ÜBERWACHUNG DER REAGENZFÖRDERUNG IN EINEM ABTASTSPEKTROPHOTOMETER

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 690 28 312 T 2

DE 690 28 312 T 2

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Überwachen der Reagensabgabe in einem Abtastspektrophotometer und auf ein für ein solches Verfahren geeignetes Reagens.

Bei derzeitigen Reagensabgabesystemen besteht ein Problem darin, dass es nach der Zugabe eines Reagens in ein Reaktionsgemisch schwierig ist, die tatsächliche Menge des im Reaktionsgemisch vorhandenen Reagens zu bestimmen. Dies ist insbesondere bei Blutkoagulierungstests ein Problem. Bei dieser Testart, wenn ein Blutkoagulierungsreagens wie Thromboplastin oder Thrombin in eine Pipette eingesaugt wird, kann Luft in die Pipette eingeblasen werden, so dass möglicherweise eine ungenügende Reagensmenge abgegeben wird.

Bei Tests obenstehender Art besteht ein weiteres Problem darin, dass es möglicherweise nicht leicht zu bestimmen ist, ob eine zu prüfende Plasmaprobe in der Reaktionsküvette vorhanden ist.

Deshalb besteht ein Ziel der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren zum genauen Messen der in ein Reaktionsgemisch abgegebenen Reagensmenge zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Bestimmen des Vorhandenseins der zu testenden Probe im Reaktionsgemisch zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht darin, ein für das oben erwähnte Verfahren geeignetes Reagens zur Verfügung zu stellen. Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Messen der Reagenskonzentration in einem Reaktionsgemisch zur Verfügung, welches folgende Schritte umfasst: Zugabe von Farbstoff zu einem Reagens, bis der Farbstoff im Reagens eine bekannte Konzentration erreicht; Mischen des Reagens mit einer Probe, um ein Reaktionsgemisch zu bilden, das eine Komponente umfasst, die mit dem Reagens reagiert, um ein Reaktionsprodukt zu bilden; Messen der Bildung eines Reaktionsprodukts in einem ersten Spektralbereich; Messen der Farbstoffkonzentration im Reaktionsgemisch in einem zweiten Spektralbereich, in dem der Farbstoff eine optische Eigenschaft wie Absorption oder Fluoreszenz aufweist, wobei sich der zweite Spektralbereich vom ersten Spektralbereich unterscheidet, und Bestimmen der Reagenskonzentration im Reaktionsgemisch auf der Basis der gemessenen Farbstoffkonzentration. Unterschiede, die im Reagens oder in der Probe durch Farbe oder Trübung verursacht werden, werden durch Normierung beseitigt, indem eine Messung von optischen Eigenschaften des Reaktionsgemischs in einem dritten Spektralbereich verwendet wird, in dem weder das Reaktionsprodukt noch der Farbstoff eine optische Eigenschaft aufweist.

Bei einer anderen Ausführung stellt die Erfindung ein Blutkoagulierungsreagens zur Verfügung, das einen Farbstoff enthält, der in einem Spektralbereich ausserhalb des Interessenbereichs des Reaktionsgemischs eine optische Eigenschaft aufweist, um die Konzentration des Reagens zu überwachen.

Figur 1 illustriert das Spektrum von Patentblau VF, das ein zur Ausführung der Erfindung geeigneter Farbstoff ist. Patentblau VF (Schwefelblau, CI42045) weist bei 635nm einen Absorptionshöchstwert und bei 410nm einen sekundären Höchstwert auf, die in der Figur dargestellt sind.

Figur 2 illustriert Patentblau VF in einer auf Thromboplastin basierenden PT-Koagulationszeitreaktion. Figur 2a zeigt den Höchstwert für das gebildete Koagulat, und Figur 2b zeigt die gleiche Reaktion mit Farbstoff im Reagens.

Das vorliegende Verfahren wird vorzugsweise zusammen mit einem optischen Überwachungssystem angewendet wie dasjenige, das in der gleichzeitig angemeldeten WO-A-91/08455 offenbart wird, die den Titel "Vielkanaliges optisches Überwachungssystem" trägt und auf den Inhaber der vorliegenden Anmeldung übertragen wurde. Verschiedene flüssige Reagenzien werden mit der Probe in einer Küvette gemischt, um eine Reaktion zu bilden, deren optischen Eigenschaften überwacht werden. Das System wird im Prinzip zum Durchführen von Tests an Blutplasma wie PT- und APTT-Tests verwendet, welche die Zugabe von Thromboplastin, Thrombin und CaCl_2 einschliessen, um Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln und ein Koagulat zu bilden.

Bei der vorliegenden Erfindung wird eine bekannte Menge Farbstoff einer bekannten Menge eines der dem Reaktionsgemisch zugebenden Reagenzien zugefügt. Die Farbstoffkonzentration im Reagens beträgt vorzugsweise ungefähr ein Tausendstel. Vorzugsweise wird der Farbstoff Blutkoagulierungsreagenzien wie Thromboplastin, Thrombin oder CaCl_2 zugegeben, wobei der Farbstoff aber auch anderen Reagenzien einer Koagulierungs- oder anderen Reaktion zugegeben werden kann.

Der dem Blutkoagulierungsreagens zugegebene Farbstoff weist die optische Eigenschaft auf, entweder Licht auf einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren oder Licht einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren. Ungeachtet der optischen Eigenschaft des Farbstoffs sollte dieser mit dem Inhalt des Reaktionsgemischs kompatibel sein und eine optische Eigenschaft in einem Spektralbereich aufweisen, der ausserhalb des Interessenbereichs des Reaktionsgemischs liegt, das heisst des Bereichs, in dem die Messung der Reaktionsproduktbildung durchgeführt wird.

Wenn zum Beispiel das Reagens ein Blutkoagulierungsagens wie Thrombin oder Thromboplastin und die Probe Blutplasma in einem Koagulierungstest ist, kann ein geeigneter lichtabsorbierender Farbstoff, beispielsweise eine blaue Farbe, dem Thrombin zugegeben werden, bevor das Thrombin dem zu testenden Plasma zugefügt wird. Ein bevorzugter Farbstoff für diesen Zweck ist Patentblau VF®, das ein Spektrum wie in Figur 1 dargestellt aufweist. Wie diesem Spektrum entnommen werden kann, weist Patentblau VF eine grosse Durchlässigkeit auf und somit eine geringe Absorption im Bereich 400-550nm, dem Bereich, in dem üblicherweise das Koagu-

4

lieren von Blut bei einem Koagulierungstest mit einem Spektrophotometer überwacht wird, wobei es hingegen im Bereich von 635nm eine hohe Absorption aufweise. Während der genaue Absorptionsbereich des Farbstoffs nicht kritisch ist, absorbiert der Farbstoff vorzugsweise im Bereich 400-550nm nicht wesentlich, in einem Bereich ausserhalb dieses Bereichs aber wesentlich.

Durch Überwachung der Farbstoffkonzentration im Reaktionsgemisch auf einer Wellenlänge, auf der diese absorbiert, kann die Thrombinkonzentration im Reaktionsgemisch bestimmt werden. Eine Anzeige von zuviel Absorption auf der Wellenlänge des Farbstoffs bedeutet, dass das Thrombin noch nicht genügend verdünnt wurde, bevor das Thrombin dem Plasma zugefügt wurde, oder dass im Reaktionsgemisch kein Plasma vorhanden oder nicht in den richtigen Proportionen vorhanden ist. Dagegen bedeutet zu geringe Absorption auf der Wellenlänge des Farbstoffs entweder, dass nicht genug Thrombin zugegeben wurde, oder dass zuviel Plasma im Reaktionsgemisch vorhanden ist.

Falls vom Spektrophotometer auf der Wellenlänge des Farbstoffs entweder zuviel oder zuwenig Absorption gemessen wird, macht das Spektrometer den Bediener durch eine Anzeige oder einen Ausdruck auf das Problem aufmerksam. Wenn allen Reagenzien ein geeigneter Farbstoff zugefügt wird und dann die Absorption nach der Abgabe des Reagens während kurzer Zeit auf einer geeigneten Wellenlänge überwacht wird, kann die Menge Reagens plus Plasma gut genug bestimmt werden, um zu wissen, ob sowohl Plasma als auch Reagens im Reaktionsgemisch vorhanden sind.

Nach der vorliegenden Erfindung werden bichromatische Techniken verwendet, worin die Durchlässigkeit in einem dritten Bereich gemessen wird, der vom Farbstoff oder von der Reaktion nicht beeinflusst wird. Dadurch können alle voranalytischen Variablen eliminiert werden, um den Test für die Unterschiede unter den Instrumenten, Proben und Reagenzien zu standardisieren, während dennoch der Vorteil erhalten wird, die Konzentration des Farbstoffs, und somit des Reagens, gleichzeitig mit der stattfindenden Reaktion messen und die Resultate gleichzeitig bestimmen zu können.

Für Tests, die bichromatische Techniken verwenden, ist der bevorzugte Farbstoff Patentblau VF (CI Lebensmittelblau 3, #42045), der einen primären Höchstwert bei 635nm und einen se-

kundären Höchstwert bei 410nm aufweist. Es können Derivate von Patentblau VF oder alle anderen Farbstoffe verwendet werden, welche die Bedingungen erfüllen, dass sie die Reaktion (Koagulatbildung) nicht beeinflussen, dass sie Durchlässigkeitshöchstwerte auf Wellenlängen aufweisen, die von der Anwesenheit von Plasma nicht beeinträchtigt werden, dass sie mit den therapeutischen Arzneimitteln (zum Beispiel Heparin) nicht reagieren, und dass sie kompatibel sind mit Calciumchlorid, Thromboplastin, Thrombin oder irgendeinem anderen Reagens, das in einem spezifischen Test verwendet wird.

Bichromatische Techniken basieren auf der Messung der Durchlässigkeit in drei Wellenlängenbereiche. Die erste Messung wird an einer Wellenlänge vorgenommen, die durch den spezifischen Test beeinflusst wird. Zum Beispiel wird die Koagulierung von Blut durch Absorption im Bereich von 400-550nm gemessen. Die zweite Messung wird in einem Bereich vorgenommen, in dem der Farbstoff Licht absorbiert, der aber von der Reaktion nicht beeinflusst wird. Zum Beispiel ist 635nm der spektrale Höchstwert für Patentblau VF. Die dritte Messung wird in einem Spektralbereich vorgenommen, der weder vom Farbstoff noch von der Reaktion beeinflusst wird. Für Blutkoagulationstests nahmen wir die dritte Messung im Bereich von 705 bis 715nm vor. Es kann jedoch jeder andere Bereich, der weder von der Reaktion noch vom Farbstoff beeinflusst wird, gewählt werden. Beim oben erwähnten Beispiel könnte die dritte Messung unterhalb 400nm, beispielsweise bei 250nm gewählt werden.

Um die Bestimmung von Farbstoffkonzentrations-Durchlässigkeitseigenschaften der Probe und des Reagens zu standardisieren, wird folgende Formel verwendet: $\text{Farbstoffkonzentration} = r(635\text{nm})/r(705\text{nm})$, worin r = das Signal bei der Reaktionszeit 0/Signal von Wasser ist. Durch Dividieren des r -Wertes durch das Signal des Wassers in der Küvette wird die Bestimmung der Unterschiede von Instrument zu Instrument korrigiert. Durch Dividieren von $r(635\text{nm})$ durch $r(705\text{nm})$ wird bei der Berechnung der Farbstoffkonzentration eine Korrektur für die Interferenz und Durchlässigkeit vorgenommen, die von der Trübung oder Farbdichte in der Probe oder im Reagens herrühren. Dies ist ein Ausgleich für Veränderungen im zur Verfügung stehenden Licht, der tatsäch-

lich jede Veränderung der Lichtquelle oder Durchlässigkeit aller Reaktionsgemisch-bildenden Materialien ausgleicht.

Bei der bevorzugten Ausführung für Koagulierungstests von Blutplasma wird das Absorptionsvermögen auf einer Lichtwellenlänge von 705nm gemessen, um solche Probenunterschiede zu korrigieren. Ähnliche Resultate können innerhalb einem Bereich von Wellenlängen, einschliesslich 705nm, erhalten werden wie beispielsweise 700 bis 715nm, solange die Wellenlänge eine solche ist, auf der die Probe Licht absorbiert. Zum Beispiel verursacht die Trübung oder die Lichtdichte von Plasma, insbesondere von Verunreinigungen wie Bilirubin, dass Licht im ungefähren 705nm-Wellenlängenbereich absorbiert wird. Da das Absorptionsvermögen des Farbstoffs beispielsweise für Patentblau im 635nm-Bereich liegt, und das Absorptionsvermögen des Koagulats für diese Blutkoagulierungstests im 400-550nm-Bereich liegt, eliminiert ein Ausgleich des Absorptionsvermögens bei 705nm die Unterschiede, die von den Verunreinigungen in der Probe stammen.

Obwohl sich die obige Beschreibung auf ein spezifisches Reagens und ein spezifisches Reaktionsgemisch bezogen hat, kann die Erfindung auch mit anderen geeigneten Reagenzien und Reaktionsgemischen ausgeführt werden. Im weiteren kann die Zugabe von mehr als einem Reagens überwacht werden, indem Farbstoffe, die unterschiedliche Hauptabsorptionswellenlängen aufweisen, den Reagenzien zugegeben werden, und die Konzentration jedes Farbstoffs im Reaktionsgemisch überwacht wird.

Auf eine Weise, die der oben für einen lichtabsorbierenden Farbstoff erläuterten ähnlich ist, kann dem Blutkoagulierungsgemisch ein Farbstoff zugegeben werden, der in einem Bereich ausserhalb des Interessenbereichs für das Reaktionsgemisch Licht fluoresziert. Wenn anstelle eines lichtabsorbierenden Farbstoffs ein fluoreszierender Farbstoff verwendet wird, wird die Reagenskonzentration überwacht, indem die Anwesenheit von Licht infolge Fluoreszenz auf einer bestimmten Wellenlänge gemessen wird.

Ein geeigneter fluoreszierender Farbstoff für diesen Zweck ist Rhodamin B, das im Rotbereich des Spektrums fluoresziert. Während der fluoreszierende Farbstoff im Interessenbereich des Reaktionsgemischs vorzugsweise nicht wesentlich Licht absorbiert, kann er auf jeder anderen Wellenlänge des Spektrums Licht absorbieren.

BEISPIEL I

APTT-Test:

Patentblau VF, mit einer Konzentration von 8mg/l in CaCl_2 , wurde mit einer Kontrollmenge CaCl_2 auf der Coag-A-Mate X2 (Organon Teknika Corporation) verglichen. Eine 1%ige Zunahme der Koagulierungszeit erfolgte, wenn der Farbstoff vorhanden war, was der Tatsache zugeschrieben wurde, dass die X2-Optik Koagulierungsbildung bei ungefähr 620nm feststellt, was mit der Durchlässigkeit des Farbstoffs übereinstimmt. Die CaCl_2 -Farbstofflösung wurde ebenfalls bei 565nm evaluiert. Es wurde bei 565nm kein bedeutender Unterschied in der Wellenform festgestellt, wenn der Farbstoff vorhanden war. Die Endkonzentration des Farbstoffs in der Probe betrug 3mg/l, was einer Durchlässigkeit von ungefähr 50% entspricht.

BEISPIEL II

PT-Test:

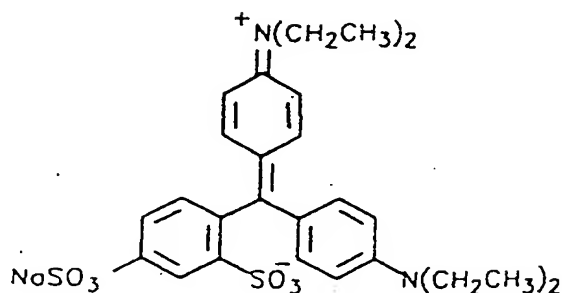
Patentblau VF wurde Thromboplastin in einer Konzentration von 1,15mg/l zugegeben, wodurch eine Proben-Endkonzentration von 0,75mg/l resultierte. Eine 1-2%ige Zunahme der PT-Koagulierungszeit erfolgte, wenn der Farbstoff dem Thromboplastin zugegeben wurde. Kein bedeutender Unterschied in der Form der Wellenlänge wurde bei 565nm festgestellt, wenn der Farbstoff vorhanden war. Die Bestimmung der Koagulatbildung war im wesentlichen vom Farbstoff unbeeinflusst.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Messen der Konzentration eines Reagens in einem Reaktionsgemisch, welches folgende Schritte umfasst:
 - Zugabe von Farbstoff zu einem Reagens, bis der Farbstoff im Reagens eine bestimmte Konzentration erreicht;
 - Mischen des Reagens mit einer Probe, um ein Reaktionsgemisch zu bilden, worin diese Probe eine Komponente umfasst, die mit dem Reagens reagiert, um ein Reaktionsprodukt zu bilden;
 - Messen der Reaktionsproduktbildung in einem ersten Spektralbereich;
 - Messen der Farbstoffkonzentration im Reaktionsgemisch in einem zweiten Spektralbereich, in dem der Farbstoff eine optische Eigenschaft aufweist, wobei sich der zweite Spektralbereich vom ersten Spektralbereich unterscheidet;
 - Messen der Durchlässigkeit des Reaktionsgemischs in einem dritten Spektralbereich, in dem weder das Reaktionsprodukt noch der Farbstoff optische Eigenschaften aufweisen; und
 - Bestimmen der Konzentration des Reagens im Reaktionsgemisch basierend auf der gemessenen Farbstoffkonzentration.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Farbstoff im zweiten Spektralbereich Licht absorbiert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, worin der Farbstoff im ersten Spektralbereich keine wesentlich Menge Licht absorbiert.
4. Verfahren nach Anspruch 1, worin weder der Farbstoff noch das Reaktionsprodukt im dritten Spektralbereich eine wesentliche Menge Licht absorbieren.
5. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Reagens Thromboplastin und die Probe Blutplasma umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Reagens Thrombin und die Probe Blutplasma umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Reagens CaCl_2 und die Probe Blutplasma umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Farbstoff eine Verbindung der Formel



umfasst und der zweite Spektralbereich sich im Bereich von ungefähr 635nm befindet.

9. Verfahren nach Anspruch 1, worin der Farbstoff im zweiten Spektralbereich Licht fluoresziert.

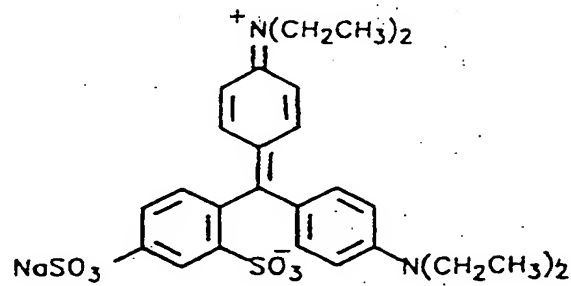
10. Verfahren nach Anspruch 9, worin der Farbstoff Rhodamin B umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 1, welches weiter das Bestimmen, ob die Probe dem zugegebenen Reaktionsgemisch zugegeben wurde, umfasst, und zwar auf der Basis der Farbstoffkonzentration im Reaktionsgemisch.

12. Verfahren nach Anspruch 1, worin der zugegebene Farbstoff eine Konzentration von ungefähr 1 Tausendstel des Reagens aufweist.

13. Zusammensetzung, welche ein Blutkoagulierungsreagens, das einen Farbstoff enthält, um die Reagens- oder Probenabgabe zu überwachen, umfasst, wobei dieser Farbstoff eine optische Eigenschaft in einem Bereich ausserhalb des Bereichs von ungefähr 400nm bis 550nm aufweist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieses Blutkoagulationsreagens Thrombin umfasst.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieses Blutkoagulationsreagens Thromboplastin umfasst.
16. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieses Blutkoagulationsreagens CaCl_2 umfasst.
17. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieser Farbstoff in einem Bereich ausserhalb des Bereichs von ungefähr 400nm bis 550nm Licht absorbiert.
18. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieser Farbstoff in einem Bereich ausserhalb des Bereichs von ungefähr 400nm bis 550nm fluoresziert.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 13, worin dieser Farbstoff eine Verbindung der Formel

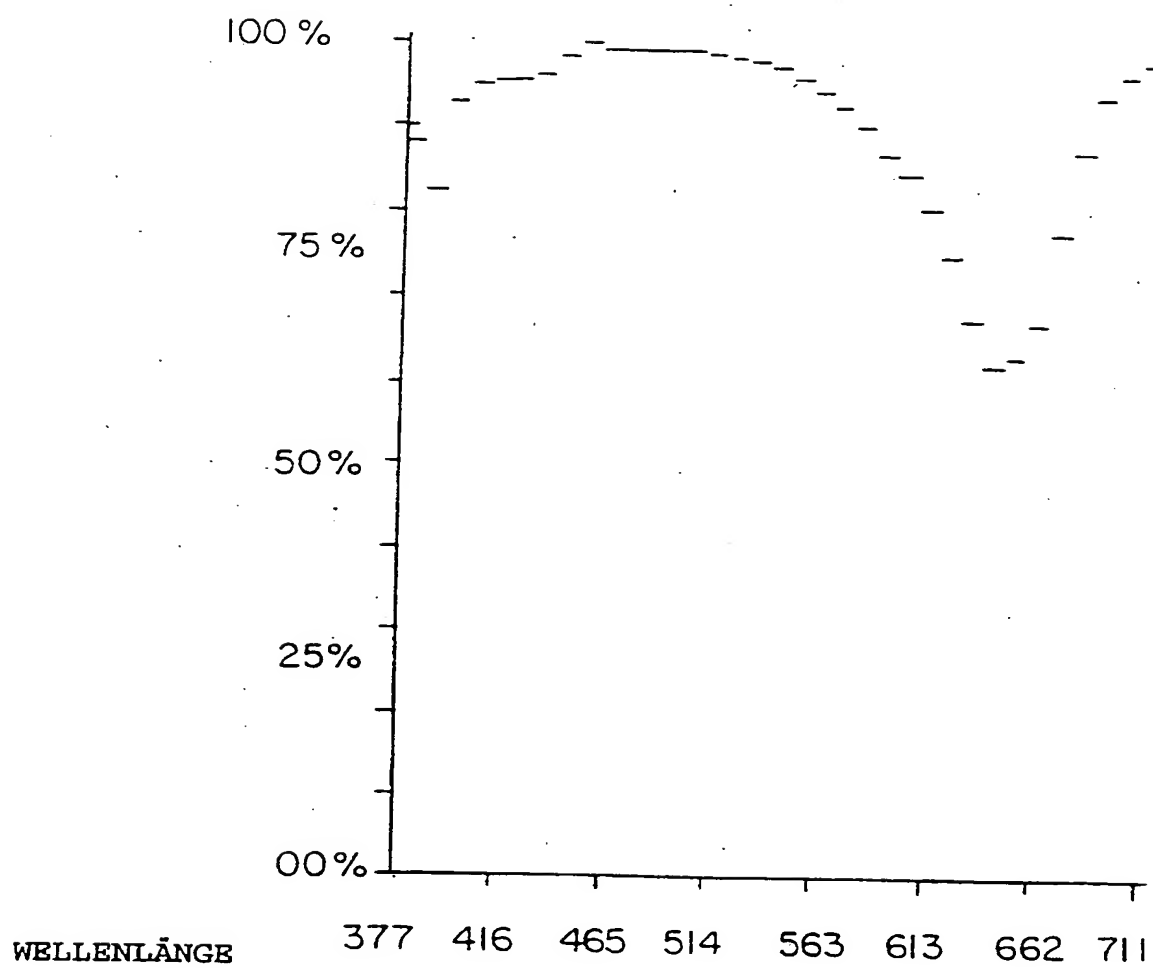


umfasst.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin dieser Farbstoff Rhodamin B umfasst.

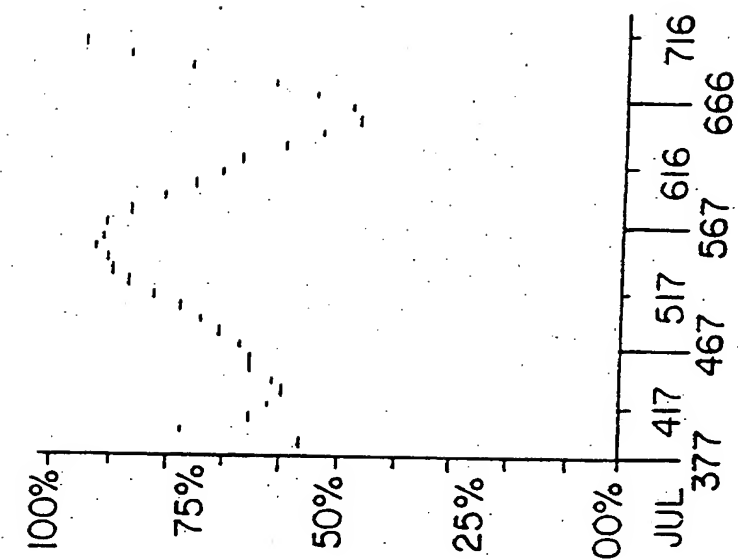
1 / 2

FIG. 1



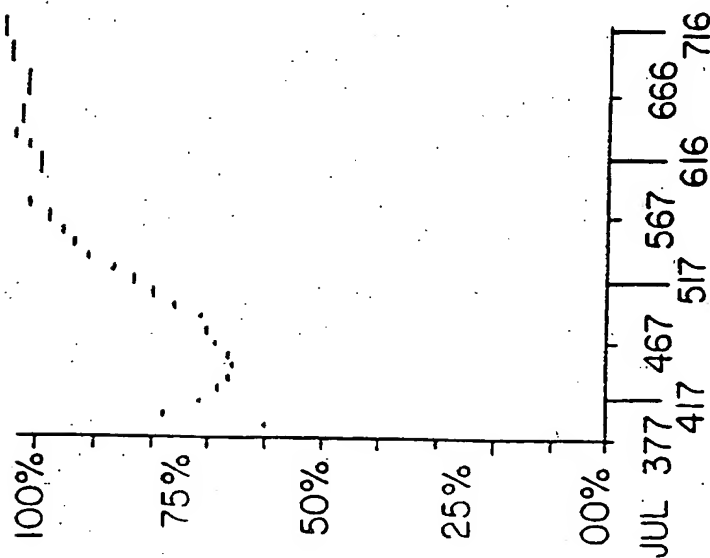
2 / 2

FIG. 2b



PATENTBLAU VF IN THROMBOPLASTIN

FIG. 2a



KONTROLLE

THIS PAGE BLANK (USPTO)